Simplexa™ Dengue

REF MOL3100
Rev. C

Ein Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Assay für den Nachweis und die Typisierung der Dengue-Virus-Serotypen 1, 2, 3 und 4 *in vitro*.



In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der Simplexa™ Dengue Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) - Assay von Focus Diagnostics ist für die Anwendung auf dem 3M Integrated Cycler für den *in vitro*-Nachweis und die Typisierung der Serotypen 1, 2, 3 und 4 des Dengue-Virus in Humanserum bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Dengue Fieber (DF) ist eine akute, sich selbst begrenzende, virale Erkrankung, die durch Fieber, Kopfschmerzen, Schmerzen im gesamten Körper, Hautausschläge, Lymphadenopathie und Erschöpfung gekennzeichnet ist. Bei Vorliegen der schwersten Form einer Dengue-Fieber-Infektion, dem Hämorrhagischen Dengue-Fieber (DHF), leidet der Patient unter hohem Fieber und Nierenversagen, was zum häufig tödlichen Dengue-Schock-Syndrom (DSS) führt.[1] Schätzungen zufolge sind weltweit etwa zwei Milliarden Menschen dem Risiko einer Infektion mit DF ausgesetzt und pro Jahr werden bis zu 100 Millionen Menschen infiziert.[2,3] Zusammen mit den hunderttausenden von Fällen an DSS stellen diese Zahlen den Grund dafür dar, dass Dengue weltweit als die wichtigste durch Arboviren hervorgerufene Krankheit gilt.[4]

Auf DHF wurde man erstmalig in den 1950er Jahren während der Dengue-Epidemien auf den Philippinen und in Thailand aufmerksam. Bis 1970 gab es in neun Länder DHF-Epidemien und mittlerweile hat sich diese Zahl mehr als vervierfacht und steigt weiterhin an. Heutzutage sind neu auftretende DHF-Fälle für eine Zunahme von Dengue-Epidemien in Nord-, Mittel- und Südamerika verantwortlich. In Asien, wo alle vier Dengue-Virus-Subtypen endemisch sind, ist DHF in mehreren Ländern eine führende Ursache für Einweisungen ins Krankenhaus und für Todesfälle bei Kindern.[5]

Das Dengue-Virus (DV) ist ein Einzelstrang-RNA-Virus der Flavivirus-Familie und eng verwandt mit dem Gelbfiebervirus, dem Japanischen Enzephalitis Virus und anderen Arboviren der Gruppe B. Es gibt 4 Dengue-Virus-Stämme, die sich alle serologisch unterscheiden. Eine Infektion mit einem bestimmten Stamm schützt den Wirt nicht vor einer Infektion mit anderen Stämmen. Vielmehr deutet ein Bericht darauf hin, dass DHF und DSS besonders häufig in Personen auftreten, die zuvor durch einen anderen Stamm infiziert worden sind.[6] Das Vorhandensein zirkulierender, nicht-neutralisierender, kreuzreaktiver DV-Antikörper kann die Infektion immunologisch sogar verstärken.[6] Nicht-neutralisierende, kreuzreaktive Antikörper gegen andere nicht-DV-Flaviviren bewirken jedoch keine immunologische Verstärkung der Infektion.[6]

Das Dengue-Virus kann überall da übertragen werden, wo die Mosquitovektoren *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* vorkommen. *A. aegypti* kommt hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Gebieten Amerikas vor und ist im Süden der USA heimisch.[4] In Asien stellt *A. albopictus* den hauptsächlichen Überträger von Dengue dar. In jüngster Zeit wurden lokal erworbene Dengue-Infektionen in Florida Key West und Miami-Dade County beschrieben.[7]

In der Vergangenheit wurden Verdachtsfälle von DF mit serologischen Methoden diagnostiziert. Sowohl virusspezifische Immunglobulin G (IgG)- als auch IgM-Antikörper sind in der Regel im Serum von Patienten mit akuten Primärinfektionen vorhanden, während die IgM-Antwort bei sekundären Dengue-Fieber-Infektionen abgeschwächt sein bzw. sogar fehlen kann.[8] Darüber hinaus gibt es innerhalb der Flavivirus-Familie eine starke Kreuzreaktivität. Die Interpretation der Antikörper-Antwort in Bezug auf akutes Dengue-Fieber kann daher schwierig sein, wenn andere Flavivirus-Infektionen mit klinischen, laboratorischen oder epidemiologischen Mitteln nicht ausgeschlossen werden können. In jüngster Zeit wurden Real-Time-RT-PCR-Methoden entwickelt, um Dengue-Viren in Patientenblut nachzuweisen. Der Nachweis von Dengue-Virus-RNA durch Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) in Humanseren ist ein starker Hinweis auf akutes Dengue-Fieber.[9] Dengue-Viren können im Blut (Serum) von Patienten für etwa 5 Tage nach Beginn der Symptome nachgewiesen werden.[10]

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Der Assay ist eine Real-Time-RT-PCR, die zwischen den Serotypen 1 und 4 in einer Reaktion (Probenvertiefung (engl. well)) und den Serotypen 2 und 3 in einer anderen Reaktion (Probenvertiefung) unterscheidet. Der Test besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: (1) RNA-Extraktion aus den Proben, und (2) Amplifikation der extrahierten RNA mit Hilfe bifunktioneller, fluoreszenzmarkierter Primersonden und reverser Primer. Der Assay amplifiziert vier serotyp-spezifische Regionen: Dengue 1 (NS5 -Gen), Dengue 2 (NS3-Gen), Dengue 3 (NS5-Gen) und Dengue 4 (Kapsid-Gen). Zur Überprüfung der Extraktion und zur Erkennung einer RT-PCR-Hemmung wird eine interne RNA-Kontrolle mitgeführt.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Das Simplexa Dengue-Kit enthält ausreichend Reagenzien für die Serotypisierung von 100 Proben.

Beschreibung des Kits

Bezeichnung der Komponente	REF	EG-SYMBOL AUF ETIKETT		Kurz-bezeichnung	Deckel-farbe	Anzahl Gefäße	Reaktionen pro Gefäß/Kit	Volumen pro Gefäß
Simplexa Dengue 1 & 4 Primer Mix	**MOL3101**	**REAG**	**A**	**PM**	Braun	2	50/100	30 µl
Simplexa Dengue 2 & 3 Primer Mix	**MOL3102**	**REAG**	**B**	**PM**	Lila	2	50/100	30 µl
HS Master Mix	**MOL9060**	**REAG**	**C**	**MM**	Grün	4	50/200	200 µl
RT Mix	**MOL9103**	**REAG**	**D**	**RT**	Gelb	2	100/200	50 µl
Simplexa RNA Internal Control	**MOL2004**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Blau	2	50/100	250 µl
Simplexa Dengue Molecular Control	**MOL3103**	**CONTROL**	**+**	**MC**	Rot	2	4/8	800 µl

Beschreibung der Komponente

<table>
<tr><th>Kit-Komponente</th><th>Beschreibung</th></tr>
<tr><td>Simplexa Dengue 1 & 4 Primer Mix (PM)</td><td>Mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer, die Dengue-Serotyp 1-RNA, Dengue-Serotyp 4-RNA und die interne Kontrolle (IC) spezifisch erkennen.
<table>
<tr><th>Ziel</th><th>Sonden-Fluorophor (Farbstoff)</th><th>Anregung</th><th>Emission</th><th>Zielgen</th></tr>
<tr><td>Dengue 1 (DV1)</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>NS5-Gen</td></tr>
<tr><td>Dengue 4 (DV4)</td><td>CFR610</td><td>590 nm</td><td>610 nm</td><td>Kapsid-Gen</td></tr>
<tr><td>Interne Kontrolle (RNA IC)</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>n. z.</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Simplexa Dengue 2 & 3 Primer Mix (PM)</td><td>Mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer, die Dengue-Serotyp 2-RNA, Dengue-Serotyp 3-RNA und die interne Kontrolle spezifisch erkennen.
<table>
<tr><th>Ziel</th><th>Sonden-Fluorophor (Farbstoff)</th><th>Anregung</th><th>Emission</th><th>Zielgen</th></tr>
<tr><td>Dengue 3 (DV3)</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>NS5-Gen</td></tr>
<tr><td>Dengue 2 (DV2)</td><td>CFR610</td><td>590 nm</td><td>610 nm</td><td>NS3-Gen</td></tr>
<tr><td>Interne Kontrolle (RNA IC)</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>n. z.</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>HS Master Mix (MM)</td><td>DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ RNA Internal Control (RNA IC) (interne RNA-Kontrolle)</td><td>Verkapselte RNA-Matrize.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Dengue Molecular Control (MC) (Molekularkontrolle)</td><td>Inaktivierte Dengue-Virus-Serotypen 1, 2, 3 und 4.</td></tr>
<tr><td>RT-Mix (RT)</td><td>Reverse Transkriptase (Enzym), Puffer</td></tr>
</table>

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. Integrated Cycler von 3M mit Integrated Cycler Studio-Software, Version 4.2 oder höher
2. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler
3. Universal Disc-Abdeckfolie
4. Nukleasefreies Wasser (empfohlen zur Verwendung als Leerwert-Kontrolle (No-Template Control, NTC))
5. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
6. Roche MagNA Pure LC System und zugehöriges Verbrauchsmaterial
7. Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.-Nr. 3038505001)
8. Universal Disc-Ladeblock
9. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
10. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Proben (bei Bedarf)

11. Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C (für aufgetaute Kit-Komponenten)
12. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
13. Mikrozentrifuge
14. Vortex-Mischer
15. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
16. 1,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
17. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
18. Kühlständer für 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Reagenzien bei -10 bis -30 °C aufbewahren (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).
2. Kits und Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden.
3. Primer-Mixe, HS Master-Mix, Molekularkontrolle und interne RNA-Kontrolle vor Gebrauch bei Raumtemperatur auftauen lassen (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C).
4. Die Reaktionsgemische nach Zugabe des RT-Mix innerhalb einer Stunde verwenden.
5. Falls das PCR-Setup nicht sofort nach Herstellung der Reaktionsmischungen durchgeführt wird, können die Reaktionsmischungen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, bis das PCR-Setup (innerhalb einer Stunde) durchgeführt werden kann.
6. Den RT-Mix nach jedem Gebrauch bis zum Verfalldatum einfrieren (-10 °C bis -30 °C).
7. Primer-Mixe, HS Master-Mix, Molekularkontrolle und die interne RNA-Kontrolle aufgetaut nicht länger als 30 Tage bei 2 bis 8 °C aufbewahren.
8. Primer-Mix, HS Master-Mix, interne RNA-Kontrolle oder Molekularkontrolle nicht wieder einfrieren.
9. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen kombinieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Befolgen Sie die allgemein anerkannten Vorsichtsmaßahmen. Sämtliche Untersuchungsproben und molekulare Kontrollen sind als potenziell infektiös zu betrachten und dementsprechend zu handhaben.
2. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung, wie unter anderem Handschuhe und Laborkittel, tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien oder Humanproben gehandhabt werden, darf nicht geraucht, getrunken und gegessen werden. In diesen Bereichen ist auch das Einsetzen/Herausnehmen von Kontaktlinsen oder das Auftragen von Make-up nicht erlaubt.
5. Nicht verwendete Kit-Reagenzien bzw. Untersuchungsproben gemäß den örtlichen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
6. Der Arbeitsablauf im Labor sollte stets in einer Richtung erfolgen, ausgehend von den Probenvorbereitungsbereichen in Richtung Amplifikations-/Detektionsbereich. Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Arbeitsschritte von der Probenextraktion bis zur Amplifikation mittels Real-Time-PCR beschrieben:
    - Am Anfang steht die Probenextraktion, gefolgt von der Einstellung des Geräts zur Durchführung der Real-Time-PCR, der Zubereitung der Reagenzien und schließlich der Amplifikation mittels Real-Time-PCR.
    - Die Verbrauchsmaterialien und Instrumente dürfen nicht bereichsübergreifend außerhalb der speziellen Probenextraktions- und Probenvorbereitungsbereiche verwendet werden. Sie sollten auch nicht zwischen den verschiedenen Bereichen ausgetauscht werden.
    - Verbrauchsmaterialien und technische Ausstattung für die Probenvorbereitung dürfen nicht für die Reagenzienzubereitung oder zur Verarbeitung amplifizierter DNA oder anderer Quellen der Zielnukleinsäure verwendet werden.
    - Sämtliche Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Amplifikation müssen stets im Bereich des Real-Time-PCR-Geräts verbleiben.
    - Auch die persönliche Schutzausrüstung, wie z.B. Laborkittel und Einmalhandschuhe, sollten bereichsspezifisch gehandhabt werden.
7. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
8. Die Reagenzien vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Vertiefungen zu verhindern.
9. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
10. Die Reagenzien nicht gegen Reagenzien anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen oder mit diesen mischen.
11. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies kann zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
12. Bei Nichteinhaltung dieses Protokolls oder der angegebenen Zeiten oder Temperaturen kann es zu fehlerhaften Testergebnissen kommen.
13. Der Testansatz sollte bei Raumtemperatur (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C) erfolgen. Die Enzyme beim Mischen der Reagenzien in einem Kühlblock gekühlt halten.
14. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Untersuchungsproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
15. Gebrauchte Discs ohne Ablösen oder Entfernen der Abdeckfolie entsorgen.



16. Wenn verschiedene Simplexa™ Kits oder Chargen auf der gleichen Disc angesetzt werden, sollten die Molekularkontrollen aus jedem verwendeten Kit getestet werden.
17. HS Master-Mix und RT-Mix enthalten > 1 % Glycerin, welches nach Inhalation oder Hautkontakt zu Reizungen führen kann. Nach Einatmen oder Berührung sollten Erste-Hilfe-Maßnahmen eingeleitet werden.
18. Eine längere Aufbewahrung extrahierter Proben bei 2 °C bis 8 °C wird nicht empfohlen. Die Leistungsfähigkeit des Tests unter diesen Bedingungen wurde nicht geprüft.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A. PROBENGEWINNUNG

Geeignete Probentypen sind Seren. Blutproben sind aseptisch unter Anwendung standardisierter Blutabnahme-Techniken und durch qualifiziertes Personal zu entnehmen.[11] Blutproben bei Zimmertemperatur koagulieren lassen und das Serum anschließend durch Zentrifugieren abtrennen. Das Serum zur Aufbewahrung aseptisch in einen fest verschließbaren, sterilen Behälter überführen.

Abgetrenntes Serum sollte höchstens 8 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden. Falls der Test nicht innerhalb von 8 Stunden abgeschlossen werden kann, ist die Probe bei 2 °C bis 8 °C zu kühlen. Kann der Test nicht innerhalb von 48 Stunden abgeschlossen werden oder werden die Proben verschickt, sollten die Proben bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Das wiederholte Einfrieren/Auftauen von Proben ist zu vermeiden.[11] Proben vor dem Gebrauch auftauen und gut mischen.

B. PROBENEXTRAKTION

Extraktion mit dem Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren

1. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Patientenproben und Assaykontrollen erfolgt mit dem Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid-Kit und dem Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät. Bei der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit sind die Gebrauchsanweisungen des Herstellers zu beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Verwenden Sie das Probenprotokoll „Total NA Variable_elution_volume“.
4. Als Probenvolumen sollte 200 µL und als Elutionsvolumen 50 µL eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ eingestellt sein.
7. Achten Sie darauf, dass sich die Proben und Kontrollen auf der Probenkartusche in den richtigen Positionen befinden.
8. Jede Probe und die Molekularkontrolle 2 - 4 Sekunden vortexen und kurz anzentrifugieren, um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.
9. 200 µl von jeder Probe, Molekular (MC)- oder Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position in der Probenkartusche pipettieren.
10. Den Füllpegel der Proben und Kontrollen in der Probenkartusche einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass Probe(n) zugegeben wurde(n).
11. Die Interne RNA-Kontrolle 2 Mal kurz vortexen und kurz anzentrifugieren, um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.
12. In jede Proben- und alle Kontroll-Vertiefungen 5 µl Interne RNA-Kontrolle pipettieren. Zwischen den Proben die Pipettenspitzen wechseln.
13. Die Probenkartusche mit den Proben in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Kontrollen und Patientenproben aus dem MagNA Pure-Extraktor herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte RNA vor der Verwendung bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitaufbewahrung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte RNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

C. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE REAL-TIME-PCR

1. Im Bedienungshandbuch für den Integrated Cycler wird detailliert beschrieben, wie die Integrated Cycler Studio Software im einzelnen zu konfigurieren ist, um Assays auf dem Integrated Cycler zu definieren sowie Läufe einzurichten und zu analysieren.

Hinweis: Es gibt zwei verschiedene Assay-Barcodes. Ein Barcode enthält die Assay-Definition für die Dengue-Serotypen 1 und 4; der zweite Barcode enthält die Assay-Definition für die Dengue-Serotypen 2 und 3. Zwei Laufsegmente sind notwendig, um Ergebnisse für alle vier Serotypen zu erhalten.

Empfohlenes Platten-Layout – **2 Segmente sind für diesen Assay notwendig**

	Speiche 1	Speiche 2	Speiche 3	Speiche 4	Speiche 5	Speiche 6	Speiche 7	Speiche 8	Speiche 9	Speiche 10	Speiche 11	Speiche 12
A	MC	S8	S16	S24	S32	S40	MC	S8	S16	S24	S32	S40
B	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S1	S9	S17	S25	S33	S41
C	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S2	S10	S18	S26	S34	S42
D	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S3	S11	S19	S27	S35	S43
E	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S4	S12	S20	S28	S36	S44
F	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S5	S13	S21	S29	S37	S45
G	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S6	S14	S22	S30	S38	S46
H	S7	S15	S23	S31	S39	NTC	S7	S15	S23	S31	S39	NTC

Legende*:*

= Dengue 1 & 4 Reaktionsgemisch

= Dengue 2 & 3 Reaktionsgemisch

D. BEREICH FÜR DIE ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

Ein für die Vorbereitung des Reaktionsgemischs für den Dengue-Assay reservierter Bereich.

1. Primer-Mixe und HS Master-Mix bei Raumtemperatur (etwa 18 °C bis 25 °C) auftauen. Vor jedem Gebrauch die Kit-Komponenten für Primer-Mixe, HS Master-Mix und RT-Mix durch sechs- bis achtmaliges Pipettieren durchmischen und dann kurz anzentrifugieren, um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.
2. Das benötigte Volumen jeder Komponente in ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen entsprechender Größe pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemischs zuzubereiten.

Reaktionsgemisch-Volumen – Dengue 1 & 4 Reaktionsgemisch

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
HS Master Mix	4,0 µL	40 µL
Simplexa Dengue 1 & 4 Primer Mix	0,5 µL	5 µLl
RT	0,5 µL	5 µL
Gesamtvolumen	5,0 µL	50 µL

Reaktionsgemisch-Volumen – Dengue 2 & 3 Reaktionsgemisch

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
HS Master Mix	4,0 µL	40 µL
Simplexa Dengue 2 & 3 Primer Mix	0,5 µL	5 µL
RT	0,5 µL	5 µL
Gesamtvolumen	5,0 µL	50 µL

3. Jedes Reaktionsgemisch durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz bei geringer Drehzahl anzentrifugieren, um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.
5. Anschließend PCR vorbereiten.
6. Die Reaktionsgemische innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Falls die PCR nicht sofort nach Herstellung des Reaktionsgemischs vorbereitet wird, können die Reaktionsgemische bis zur PCR (maximal 1 Stunde) bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

E. BEREICH FÜR DIE REAL-TIME-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Vertiefungen für den Dengue-Assay vorbehaltenen Arbeitsbereich arbeiten. Für die Vorbereitung der Disc den Universal Disc-Ladeblock verwenden.

Bei der Durchführung folgender Vorbereitungsschritte das beispielhafte Disc-Layout in Abschnitt C beachten:

1. In jede Vertiefung 5,0 µL des entsprechenden Reaktionsgemischs geben.
2. 5,0 µL der extrahierten Molekularkontrolle in jede Vertiefung "MC" auf der Platte geben.
3. 5,0 µL der extrahierten Untersuchungsprobe in die entsprechende Vertiefung "S" auf der Platte geben.
4. 5,0 µL der extrahierten Leerwertkontrolle in jede Vertiefung "NTC" auf der Platte geben.
5. Die Platte mit Folie (Universal Disc Cover Tape) abdecken.
6. Den Deckel des Integrated Cycler öffnen.
7. Die verschlossene Universal Disc auf die Platte legen.
8. Den Deckel vorsichtig schließen.
9. Auf **Run** (Lauf) klicken.
10. Auf **Start** klicken.

F. DATENANALYSE

1. Einzelheiten zur Durchführung der Datenanalyse und zum Exportieren der Analysen, sofern dies erforderlich ist, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

RICHTLINIEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Erstellung von Ergebnisberichten erfolgt in drei Stufen.

1. Überprüfung der Validität des Segments anhand der Kontrollen. Die Interpretation der Patientenergebnisse ist in der Integrated Cycler Studio Software unterdrückt, falls eine der als Kontrollen programmierten Proben ungültig ist.
2. Überprüfung der Validität von Patientenprobenergebnissen.
3. Interpretation der Patientenergebnisse. Wenn die Kontrollen ungültig sind, können die Patientenergebnisse nicht ausgewertet werden.

1. Durch Überprüfung der Dengue-Molekularkontrolle, der Leerwert-Kontrolle und der Internen RNA-Kontrolle (RNA IC) die Validität des Laufs ermitteln.

Kriterien für eine gültige Kontrolle (vereinfacht)*

Kontrolle	Segment für Dengue 1 & 4			Segment für Dengue 2 & 3		
	DV1	DV4	RNA IC, Ct	DV2	DV3	RNA IC, Ct
Leerwert-Kontrolle	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	0	0	≤ 40,0, ≠ 0
Molekularkontrolle	≤ 40,0, ≠ 0	≤ 40,0, ≠ 0	Nicht zutreffend (n.z.)	≤ 40,0, ≠ 0	≤ 40,0, ≠ 0	Nicht zutreffend (n.z.)

* Siehe vollständige Beschreibung in den nachstehenden Anmerkungen.

a. Leerwertkontrolle (NTC) **(Segment für Dengue 1 & 4)**
   i. Wenn Ct = 0 für DV1 und DV4 und Ct $\leq$ 40 für die interne Kontrolle, dann ist diese Kontrolle gültig.

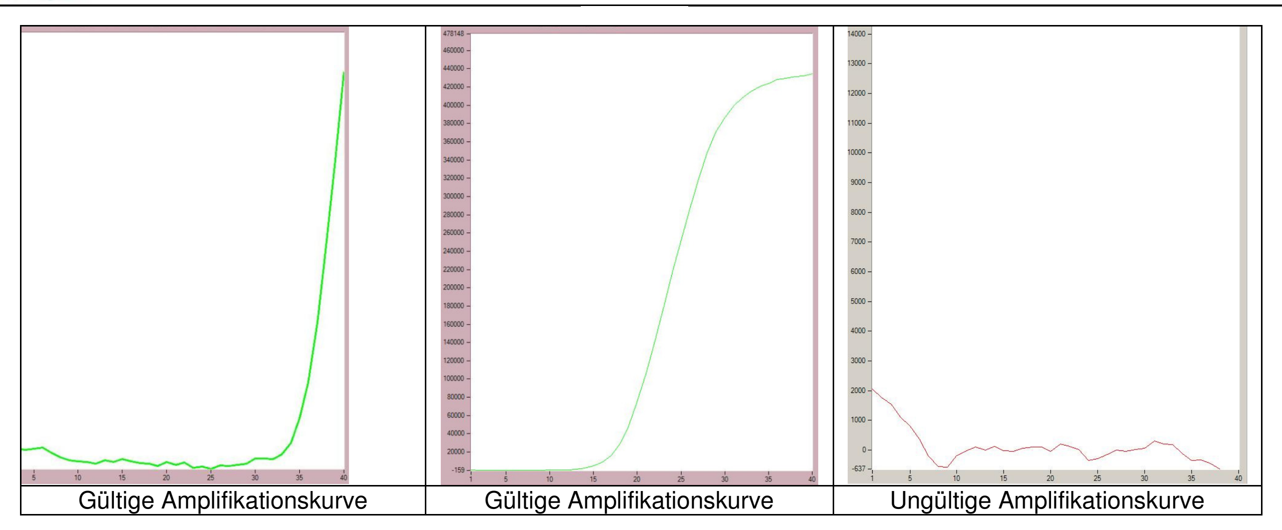
b. Leerwertkontrolle (NTC) **(Segment für Dengue 2 & 3)**
   i. Wenn Ct = 0 für DV2 und DV3 und Ct $\leq$ 40 für die interne Kontrolle, dann ist diese Kontrolle gültig.

c. Molekularkontrolle (MC) **(Segment für Dengue 1 & 4)**
   i. Wenn die Molekularkontrolle für DV1 oder DV4 einen Wert von Ct = 0 ergibt, so gilt das Assaysegment als ungültig und unzuverlässig. Alle Patientenproben müssen erneut getestet werden.
   ii. Wenn die Ct-Werte für DV1 und DV4 ≤ 40, aber ≠ 0 sind, und die Leerwertkontrolle gültig ist, wird das Assaysegment als gültig und zuverlässig angesehen.

d. Molekularkontrolle (MC) **(Segment für Dengue 2 & 3)**
   i. Wenn die Molekularkontrolle für DV2 oder DV3 einen Wert von Ct = 0 ergibt, so gilt das Assaysegment als ungültig und unzuverlässig. Alle Patientenproben müssen erneut getestet werden.
   ii. Wenn die Ct-Werte für DV2 und DV3 ≤ 40, aber ≠ 0 sind, und die Leerwertkontrolle gültig ist, wird das Assaysegment als gültig und zuverlässig angesehen.

2. Überprüfung von Patientenprobenergebnissen
   Die Ergebnisse der klinischen Proben sollten erst ausgewertet werden, nachdem die Molekular- und die Leerwert-Kontrollen überprüft und für gültig und zuverlässig befunden worden sind. Für **jedes Segment** müssen für jede Patientenprobe die Ergebnisse für DV1, DV4 und RNA IC sowie DV2, DV3 und RNA IC überprüft werden.

   a. Die Amplifikationskurven aller Ergebnisse sind zu überprüfen, insbesondere wenn eine „Data Quality“-Meldung (Datenqualität) vorliegt. Eine gültige Amplifikationskurve zeigt einen stufenlosen exponentiellen Anstieg. Empfohlene Maßnahmen dazu finden Sie im Benutzerhandbuch.



Gültige Amplifikationskurve	Gültige Amplifikationskurve	Ungültige Amplifikationskurve

b. Wenn die Amplifikationskurve für das Target gültig ist, muss für die interne RNA-Kontrolle kein positives Ergebnis angezeigt werden.

3. Interpretation der Ergebnisse.

Interpretation der Ergebnisse

	Segment für Dengue 1 & 4				Segment für Dengue 2 & 3			
Beispiel	**DV1 Ct-Wert**	**DV4 Ct-Wert**	**Ct-Wert der Internen RNA-Kontr.**	**Interpretation**	**DV2 Ct-Wert**	**DV3 Ct-Wert**	**Ct-Wert der Internen RNA-Kontr.**	**Interpretation**
1	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV1 und DV4 Nicht detektiert	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV2 und DV3 Nicht detektiert
2	≤ 40,0, ≠ 0	0	n. z.	DV1 detektiert	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV2 und DV3 Nicht detektiert
3	0	≤ 40,0, ≠ 0	n. z.	DV4 detektiert	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV2 und DV3 Nicht detektiert
4	≤ 40,0, ≠ 0	≤ 40,0, ≠ 0	n. z.	DV1 und DV4 detektiert	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV2 und DV3 Nicht detektiert
5	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV1 und DV4 Nicht detektiert	≤ 40,0, ≠ 0	0	n. z.	DV2 detektiert
6	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV1 und DV4 Nicht detektiert	0	≤ 40,0, ≠ 0	n. z.	DV3 detektiert
7	0	0	≤ 40,0, ≠ 0	DV1 und DV4 Nicht detektiert	≤ 40,0, ≠ 0	≤ 40,0, ≠ 0	n. z.	DV2 und DV3 detektiert
8	0	0	0	Ungültig, erneut extrahieren und Segment wiederholen.	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.
9	n. z.	n. z.	n. z.	n. z.	0	0	0	Ungültig, erneut extrahieren und Segment wiederholen.

Ct = Zyklus-Schwellenwert. "Detektiert" entspricht einem Ct ≤ 40,0, ≠ 0. "Nicht detektiert" entspricht einem Ct = 0.

*Zur Angabe eines positiven Ergebnisses (Nachweis) ist der Nachweis der Simplexa™ internen RNA-Kontrolle (RNA IC) nicht erforderlich.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. *In-vitro*-Diagnostikum.
2. Nur für den Export bestimmt.
3. Dieser Assay ist zur Verwendung mit Serumproben vorgesehen. Er wurde nicht mit anderen Probetypen evaluiert.
4. Die Detektion der viralen Nukleinsäuren hängt von der ordnungsgemäßen Gewinnung, Handhabung, Aufbewahrung und dem Transport der Proben, sowie von der Probenvorbereitung einschließlich der Extraktion ab. Mangelnde Beachtung der ordnungsgemäßen Vorgehensweise bei einem dieser Schritte kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
5. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich vor Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
6. Alle Ergebnisse aus diesen und anderen Tests müssen im Zusammenhang mit der klinischen Anamnese, den epidemiologischen Daten und allen anderen Daten, die dem zuständigen Arzt vorliegen, betrachtet werden.
7. Die Prävalenz der Infektion beeinflusst den Vorhersagewert des Assays.

8. Wie bei anderen Tests auch, schließt ein negatives Ergebnis eine Dengue-Virus-Infektion nicht aus.
9. Falls der die Infektion verursachende Erreger Genmutationen, Insertionen, Deletionen oder Rearrangements aufweist oder wenn die Testung im Frühstadium der Erkrankung erfolgt, kann es zu falschnegativen Ergebnissen kommen.
10. Falschnegative Ergebnisse können auftreten, wenn die Probe aufgrund von Fehlern bei Entnahme, Transport oder Handhabung eine unzureichende Anzahl von Erregern enthält.
11. Wie bei anderen Testverfahren, kann es zu falschpositiven Ergebnissen kommen. Eine Wiederholung des Tests oder die Durchführung des Tests mit einem anderen Gerät kann in manchen Fällen angezeigt sein.
12. Bei dem Assay handelt es sich um ein qualitatives Testverfahren, das keine Aussage über die Gesamtmenge der detektierten Erreger erlaubt.
13. Dieser Assay kann keine Erkrankung ausschließen, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht wird.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

METHODENVERGLEICH

Ein Probenpanel mit 179 bereits charakterisierten Dengue-PCR-Ergebnissen wurde vom US Center of Disease Control and Prevention (CDC) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden mit dem Simplexa™ Dengue -Assay getestet und mit den früheren, vom CDC gemeldeten Ergebnissen verglichen.

Tabelle 1: Dengue-Virus 1 Vergleich mit früheren Ergebnissen

Früheres CDC-Ergebnis		Simplexa™ Dengue DV1		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung (beobachtet/erwartet) 95 % CI
Detektiert	32	32	0	PPA: 100,0 % (32/32) 95 % CI: 89,3 bis 100,0 %
Nicht detektiert	147	11[a]	136	NPA: 92.5 %(136/147) 95 % CI: 87,1 bis 95,8 %

PPA = Positive Prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement), NPA = Negative Prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement)

[a] Bei der Wiederholung des Tests wurden 5 von 11 Proben mit dem Simplexa Dengue-Assay und mit einem auf CDC-Veröffentlichungen basierenden internen Assay nachgewiesen. Die verbleibenden 6 Proben wurden in dem auf CDC-Veröffentlichungen basierenden Assay nicht detektiert.

Tabelle 2: Dengue-Virus 2 Vergleich mit früheren Ergebnissen

Früheres CDC-Ergebnis		Simplexa™ Dengue DV2		
	N	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung (beobachtet/erwartet) 95 % CI
Detektiert	30	29	1[b]	96,7 %(29/30) 95 % CI: 83,3 bis 99,4 %
Nicht detektiert	149	1[b]	148	99,3 %(148/149) 95 % CI: 96,3 bis 99,9 %

PPA = Positive Prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement), NPA = Negative Prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement)

[b] Die Ergebnisse waren nach wiederholter Testung unverändert.

Tabelle 3: Dengue-Virus 3 Vergleich mit früheren Ergebnissen

Früheres CDC-Ergebnis		Simplexa™ Dengue DV3		
	N	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung (beobachtet/erwartet) 95% CI
Detektiert	29	29	0	100,0 %(29/29) 95 % CI: 88,3 bis 100,0 %
Nicht detektiert	150	0	150	100,0 %(150/150) 95 % CI: 97,5 bis 100,0 %

PPA = Positive Prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement), NPA = Negative Prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement)

Tabelle 4: Dengue-Virus 4 Vergleich mit früheren Ergebnissen

Früheres CDC-Ergebnis		Simplexa™ Dengue DV4		
	N	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung (beobachtet/erwartet) 95% CI
Detektiert	38	37	1[c]	97,4 %(37/38) 95 % CI: 86,5 bis 99,5 %
Nicht detektiert	141	8[d]	133	94,3 %(133/141) 95 % CI: 89,2 bis 97,1 %

PPA = Positive Prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement), NPA = Negative Prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement)

[c] Die Ergebnisse waren nach wiederholter Testung unverändert.

[d] Bei der Wiederholung des Tests wurden 2 von 8 Proben mit dem Simplexa Dengue-Assay und mit einem auf CDC-Veröffentlichungen basierenden internen Assay als DV4 nachgewiesen. Eine Probe wurde als DV1 nachgewiesen und eine weitere Probe wurde mit beiden Assays als DV2 nachgewiesen. Die verbleibenden zwei Proben wurden nach Wiederholung des Tests in keinem der beiden Assays detektiert.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des Simplexa Dengue-Assays wurde an drei verschiedenen Geräten untersucht. Ein Probenpanel und die Molekularkontrolle wurden an jedem Gerät in dreifacher Ausführung zwei Mal pro Tag für insgesamt fünf Tage getestet. Die Negativkontrolle wurde in jedem Lauf ein Mal getestet. Jedes Gerät wurde von einem Anwender getestet, der zwei Tests des gesamten Probenpanels am Tag durchführte, d.h. pro Tag wurden zwei Datensätze erhalten. Die Reproduzierbarkeit der qualitativen Gerätereaktion und eine Bewertung der verschiedenen Variabilitätskomponenten der Ct-Werte sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der qualitativen Aussage

Reaktionsgemisch 1&4					
Proben-bezeichnung	Alle	DV1		DV4	
		Nicht detektiert	Detektiert	Nicht detektiert	Detektiert
Dengue-1 Schwach positiv	90	0	90	90	0
Dengue-1 Mäßig positiv	90	0	90	89	1
Dengue-4 Schwach positiv	90	90	0	1	89
Dengue-4 Mäßig positiv	89	89	0	0	89
Negativ	90	90	0	90	0
Negative Kontrolle	30	30	0	30	0
Molekular-kontrolle	90	0	90	0	90

Reaktionsgemisch 2&3					
Proben-bezeichnung	Alle	DV2		DV3	
		Nicht detektiert	Detektiert	Nicht detektiert	Detektiert
Dengue-2 Schwach positiv	88	0	88	88	0
Dengue-2 Mäßig positiv	88	0	88	88	0
Dengue-3 Schwach positiv	90	90	0	11	79
Dengue-3 Mäßig positiv	89	89	0	0	89
Negativ	88	88	0	88	0
Negative Kontrolle	30	30	0	30	0
Molekular-kontrolle	90	0	90	0	90

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Gerätereaktion (Ct-Werte)

Ziel	Probe	N	Mittlerer Ct	Varianzkomponente									
				Inter-Instrument/Untersucher		Inter-Tag		Inter-Lauf		Intra-Assay (Wiederhol-genauigkeit)		Gesamt	
				SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
DV1	Dengue -1 Schwach positiv	90	35,2	0,44	1,3	0,16	0,4	0,10	0,3	0,46	1,3	0,66	1,9
	Dengue -1 Mäßig Positiv	90	33,5	0,54	1,6	0,22	0,7	0,00	0,0	0,29	0,9	0,65	1,9
	Molekularkontrolle	90	34,3	0,49	1,4	0,26	0,8	0,00	0,0	0,38	1,1	0,67	2,0
DV2	Dengue -2 Schwach positiv	88	33,5	0,33	1,0	0,19	0,6	0,19	0,6	0,37	1,1	0,57	1,7
	Dengue -2 Mäßig Positiv	88	31,9	0,45	1,4	0,48	1,5	0,00	0,0	0,23	0,7	0,70	2,2
	Molekularkontrolle	90	33,2	0,37	1,1	0,59	1,8	0,11	0,3	0,49	1,5	0,86	2,6
DV3	Dengue -3 Schwach positiv	90	38,2	0,51	1,3	0,22	0,6	0,62	1,6	0,87	2,3	1,21	3,2
	Dengue -3 Mäßig Positiv	89	33,0	0,58	1,7	0,63	1,9	0,00	0,0	0,26	0,8	0,89	2,7

Ziel	Probe	N	Mittlerer Ct	Varianzkomponente									
				Inter-Instrument/Untersucher		Inter-Tag		Inter-Lauf		Intra-Assay (Wiederhol-genauigkeit)		Gesamt	
				SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
	Molekularkontrolle	90	33,4	0,54	1,6	0,42	1,3	0,00	0,0	0,29	0,9	0,75	2,2
DV4	Dengue -4 Schwach positiv	90	36,4	0,00	0,0	0,24	0,7	0,00	0,0	0,79	2,2	0,82	2,3
	Dengue -4 Mäßig Positiv	89	32,0	0,27	0,8	0,10	0,3	0,00	0,0	0,17	0,5	0,33	1,0
	Molekularkontrolle	90	34,4	0,37	1,1	0,29	0,8	0,00	0,0	0,38	1,1	0,60	1,7

Den als "Nicht detektiert" klassifizierten Ergebnissen wird ein Ct-Wert von 40,1 zum Zwecke der Analyse der Reproduzierbarkeit zugeordnet.

ANALYSEEMPFINDLICHKEIT / NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Simplexa™ Dengue-Assays wurde mit quantifizierten Beständen von Dengue-Virus-Stämmen, von denen serielle Verdünnungsreihen in Humanserum hergestellt wurden, bestimmt. Als Nachweisgrenze für jeden Assay wurde die niedrigste Konzentration mit einer Erkennung von ≥ 95 % (mindestens 19 aus 20 Replikaten) festgelegt.

Tabelle 7: Zusammenfassung Nachweisgrenze

Dengue-Serotyp	Virusstamm	Nachweisgrenze (LoD) Konzentration (PFU/ml)
Dengue-1	WHO WEST PAC 74	0,16
Dengue-2	WHO-S16803	2,0
Dengue-3	WHO-CH53489	0,2
Dengue-4	TVP-360	0,2

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT

Zusätzlich zu den für die Bestimmung der Nachweisgrenze getesteten Stämmen wurde ein weiterer Dengue-Virus-Serotyp auf die ordnungsgemäße Reaktivität im Assay untersucht. Negatives Humanserum wurde mit quantifiziertem Virusmaterial in einer bestimmten Konzentration beimpft (siehe nachfolgende Tabelle) und in dreifacher Ausführung getestet. Alle Stämme wurden ordnungsgemäß mit dem richtigen Reaktionsgemisch nachgewiesen.

Tabelle 8: Zusammenfassung Analytische Reaktivität

Virusstamm	Getestete Konzentration	Anzahl detektiert/Gesamtanzahl			
		Reaktionsgemisch 1&4		Reaktionsgemisch 2&3	
		DV1	DV4	DV2	DV3
Dengue 1, Hawaii	nicht verfügbar	3/3	0/3	0/3	0/3
Dengue 2, New Guinea C	$1{,}00 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	3/3	0/3
Dengue 3, H87	$1{,}00 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	3/3
Dengue 4, H241 Sm14	$1{,}00 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml	0/3	3/3	0/3	0/3

KREUZREAKTIVITÄT

Die analytische Spezifität des Simplexa™ Assays wurde beurteilt, indem getestet wurde, ob ausschließlich Dengue-Viren nachgewiesen werden, ohne dass es zu Kreuzreaktionen mit eng verwandten Erregern oder mit Erregern, die ähnliche klinische Symptome verursachen oder mit Erregern, die normaler Bestandteil der Flora in den zu untersuchenden Probetypen sind, kommt.

Negatives Humanserum wurde jeweils mit je einem von achtundzwanzig (28) potenziell kreuzreagierenden Erreger in klinisch relevanten Konzentrationen beimpft. Unbeimpftes Serum wurde ebenfalls getestet, um Ausgangswerte zu erhalten. Die Proben wurden in dreifacher Ausführung getestet, um eine mögliche Kreuzreaktivität zu überprüfen. Falls in einem der Detektionskanäle (DV1, DV2, DV3, DV4) in einem der drei Replikate ein Signal detektiert wurde, wurden weitere 5 Replikate zur Bestätigung getestet. Es wurde keine Kreuzreaktivität festgestellt.

Tabelle 9: Zusammenfassung Kreuzreaktivität

Kreuzreagierender Erreger	Getestete Konzentration	Anzahl detektiert/Gesamtanzahl			
		Reaktionsgemisch 1&4		Reaktionsgemisch 2&3	
		DV1	DV4	DV2	DV3
Adenovirus Kulturflüssigkeit (Typ 1)	$1{,}00 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Adenovirus Kulturflüssigkeit (Typ 7A)	$1{,}00 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Aspergillus	unbekannt	0/3	0/3	0/3	0/3

Kreuzreagierender Erreger	Getestete Konzentration	Anzahl detektiert/Gesamtanzahl			
		Reaktionsgemisch 1&4		Reaktionsgemisch 2&3	
		DV1	DV4	DV2	DV3
BK Virus	$1{,}00 \times 10^{5}$ Kopien/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Chikungunya Virus	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Zytomegalievirus (CMV)	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Enterovirus 71	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Epstein-Barr-Virus (EBV)	$1{,}00 \times 10^{5}$ Kopien/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Hepatitis B-Virus Kontrolle	$5{,}00 \times 10^{3}$ IU/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Hepatitis B-Virus Kontrolle	$1{,}00 \times 10^{4}$ IU/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Hepatitis D-Virus	unbekannt	0/3	0/3	0/3	0/3
HIV-1	$1{,}00 \times 10^{5}$ Kopien/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
HIV-2	unbekannt	0/3	0/3	0/3	0/3
HSV-1	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
HSV-2	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
HTLV-1	unbekannt	0/3	0/3	0/3	0/3
Humanes Herpes-Virus 6	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Humanes Herpes-Virus 7	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Humanes Herpes-Virus 8	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Mycobacterium tuberculosis DNA	$1{,}67 \times 10^{-3}$ µg/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Parechovirus	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Parvovirus B19 Kontrolle	$1{,}00 \times 10^{7}$ IU/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Rubellavirus	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
St. Louis Encephalitis-Virus	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Toxoplasma gondii	$1{,}00 \times 10^{6}$ Tachyzoiten/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
Varizella-Zoster-Virus	$1{,}00 \times 10^{5}$ Kopien/ml	0/3	0/3	0/3	0/3
West-Nil-Virus	unbekannt	0/3	0/3	0/3	0/3
Gelbfiebervirus	$1{,}00 \times 10^{5}$ $TCID_{50}$/ml	0/3	0/3	0/3	0/3

INTERFERENZEN

Die Leistungsfähigkeit dieses Assays bezüglich möglicherweise interferierender Substanzen wurde nicht ermittelt. Durch die automatisierte Nukleinsäureextraktion werden Verunreinigungen effektiv aus den Proben entfernt, da die Nukleinsäure während der Extraktion isoliert und gereinigt wird. Internen Kontrollen machen den Endnutzer auf eine mögliche Hemmung der PCR aufmerksam; wenn weder eines der Zielmoleküle noch die interne Kontrolle detektiert werden, ist der Assay ungültig.

KONTAMINATION DURCH VERSCHLEPPUNG

Die Amplifikation von Verschleppungen wurde mit anderen Assays für das Gerät und die Universal Disc ermittelt. Die Untersuchungen zielten darauf ab, Kontaminationen in hoch negativen Proben festzustellen. Jede Studie bestand daraus, eine stark positive und eine stark negative Probe abwechselnd auf jeder Disc zu platzieren. Der Verschleppungseffekt wurde durch Vergleich der beobachteten Negativrate für die stark negative Probe mit der erwarteten Rate unter normalen Bedingungen der Testwiederholung bestimmt. In den bisherigen Untersuchungen wurde keine signifikante Kontamination durch Verschleppung festgestellt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte, ausgehend von den vor Ort geltenden Gesetzen, Bestimmungen und der üblichen guten Laborpraxis, eigene Qualitätskontrollbereiche wie auch die Häufigkeit der Qualitätskontrollen ermitteln.

LITERATUR

1 Halstead, SB. 1980. Immunological parameters of togavirus disease syndromes. p.107-173. In RW Schlesinger (ed.), The Toga Viruses. Academic Press, Inc., New York.

2 WHO, Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, New edition (2009) WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1

3 CDC http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html
4 Gubler, DJ. 1989. Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990's: top down or bottom up. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:571-578.
5 WHO http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/
6 Halstead, SB. 1989. Antibody, Macrophages, Dengue Virus Infection, Shock, and Hemorrhage: A Pathogenic Cascade. Rev. of Inf. Dis. 11:S830-S839.
7 MMWR May 21, 2010 / 59(19);577-581
8 Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. J Clin Microbiol. 1999 Aug; 37(8):2543–7
9 Chang GJ, Trent DW, Vorndam AV, Vergne E, Kinney RM, Mitchell CJ. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. J. Clin. Microbiol. 1994 Feb; 32(2):477–83
10 Muñoz-Jordán J.L., Collins CS, Vergne E, et al. Highly sensitive detection of dengue virus nucleic acid in samples from clinically ill patients. J Clin Microbiol 2009; 47:927-931.
11 CLSI H18-A4. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 4. Auflage (2010).

AUTORISIERTE VERTRETUNG:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 - 30855 Langenhagen (Hannover) - Deutschland

BESTELLINFORMATIONEN

Telefon:	**(800) 838-4548 (nur USA)**	**(562) 240-6500 (International)**
Fax:	**(562) 240-6510**	

TECHNISCHE HILFE

Telefon:	(800) 838-4548 (nur USA)	(562) 240-6500 (International)
Fax:	(562) 240-6526	

Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

CE
PI.MOL3100.OUS
Rev. C
Erstellungsdatum: 26. April 2012

FOCUS Diagnostics
Cypress, Kalifornien 90630 USA